

機関番号:10101

研究種目:基盤研究(B)

研究期間:2007~2010

課題番号:19380148

研究課題名(和文) 低温耐性牧草の開発に向けた分子育種

研究課題名(英文) Molecular breeding for cold stress tolerant forage grasses

研究代表者

山田 敏彦(YAMADA TOSHIHIKO)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・教授

研究者番号:70343952

研究成果の概要(和文):シバ(*Zoysia japonica*)における完熟種子由来胚を外殖片とした迅速かつ効率的なカルス組織培養技術およびパーティクルガン法とアグロバクテリウム法による完熟種子由来胚へ遺伝子を導入する新技术を確立した。チモシーから単離した高重合度フルクタンを合成する遺伝子(*PpFTI*)は、低温順化条件でフルクタンと高い含量のグルコースを蓄積し、耐凍性向上に寄与することを確認した。また、ペレニアルライグラス由来 CBF 遺伝子(*LpCBFIVa*)は開花を遅らせるが、耐凍性を向上させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文):Rapid and efficient *in vitro* culture system and novel methods for particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated transformation using mature embryos as explants have been established in zoysiagrass (*Zoysia japonica*). Fructosyltransferase gene from timothy (*PpFTI*) involving a synthesis of highly polymerized fructan contributed to increase freezing tolerance by accumulation of fructan and glucose in cold acclimated plants. CBF gene (*LpCBFIVa*) from perennial ryegrass functioned with an increase of freezing tolerance with delaying flower time.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
総計	11,200,000	3,360,000	14,560,000

研究分野:農学

科研費の分科・細目:畜産学・草地学

キーワード:草地利用、飼料作物育種

## 1. 研究開始当初の背景

農業形質には分子レベルにおいて様々な物質、つまりは代謝が関与しているが、従来の植物育種技術では代謝を選抜の対象にすることは困難であった。ポストゲノム研究の一つとして、イネやシロイヌナズナ等のモデル植物における代謝関連遺伝子情報に基づくアプローチは、代謝

を望ましいものに改変できる新しい育種技術として国内外で特に注目されている。具体的には目的遺伝子の機能・発現解析により代謝ネットワークを解明し育種に有用な遺伝子を絞り込み、その遺伝子の発現を強化することである。牧草育種においても低温耐性を強化するのは重要な育種目標の一つである。低温耐性には多くの代

謝遺伝子ネットワークが関与している。CBF (C-repeat binding factor) /DREB1 (dehydration-responsive element-binding protein 1) (以下、CBF) タンパクはその一つであり、低温誘導遺伝子の転写を制御し、この遺伝子発現量と植物の耐凍性強弱との間に関係があることが、シロイヌナズナを中心に数多く研究されている。また、寒地型イネ科牧草などの越冬性植物は秋に低温に遭遇するとフルクトースのプリマーであるフルクタンを植物体内に蓄積されるが、その含量と越冬性との間に関連性が明らかにされている。研究代表者は、これまで科学研究費補助金の研究助成を受けて、寒地型牧草から、CBF やフルクタン合成酵素遺伝子を単離するなどの研究を実施してきた。次の研究段階として、これら単離された遺伝子の機能・発現を解析することは、低温耐性を牧草に付与させる際に重要な知見となる。遺伝子機能解析には、形質転換技術が有用である。特に、目的と代謝産物を生成しない植物に遺伝子導入を行って形質転換体を作成し、その生産物を解析することにより、形質転換植物体自身の遺伝子の影響を受けることなく、導入した目的遺伝子の機能を明らかにすることができる。

## 2. 研究の目的

日本に自生している暖地型イネ科牧草であるシバ(*Zoysia japonica* Steud.)は低投入型放牧用牧草として有望であるが、その欠点として低温耐性が弱く、秋の生育が劣ることが挙げられる。シバは光合成同化産物を主としてデンプンに変換して葉緑体に貯蔵するため、フルクタン合成能力を持たない。そこで、寒地型イネ科牧草由来のフルクタン合成酵素遺伝子を導入することに、得られた形質転換植物体からの解析から、遺伝子の代謝ネットワーク等の機能を明らかにする。さらに、これらの遺伝子をシバに導入することにより、シバの低温耐性の改善が期待でき、有用な育種素材を開発できる可能性が高いと考えられる。シバでは、形質転換植物を作成する技術は報告されているが、まだ、その技術は安定した技術ではない。そこで、シバにおける効率的な遺伝子組換え技術を確認しながら、寒地型牧草の低温耐性に関与する糖代謝系やCBF 遺伝子を導入することにより、これらの遺伝子機能が解明できれば、代謝系改変に向けた寒地型イネ科牧草の分子育種技術が確立されるとともに、暖地型イネ科牧草のシバの低温耐性を改良するための素材作出の両面に貢献できる

## 3. 研究の方法

(1) シバにおける培養系および遺伝子組換え技術の確立

シバにおける効率的な遺伝子組換え技術を確認するためには、植物体を効率的に再分化できる培養系が基盤として必要である。そこで、完熟種子由来胚を用いた組織培養技術の確立を行

った。次に、遺伝子導入技術として、カルス組織を用いたパーティクルガン法とアグロバクテリウムについての検討を行った。さらに、完熟種子から切り取った胚へ直接遺伝子を導入して組換え植物を得る技術に関する検討を行った。

(2) 寒地型牧草由来フルクタン合成酵素遺伝子および CBF 代謝遺伝子の機能解析

牧草から単離したフルクタン合成酵素遺伝子や CBF をシバに導入して、遺伝子の機能解析を行う。当初設定したより、シバにおける遺伝子組み換え技術開発が遅れたため、CBF 遺伝子については、シロイヌナズナへ、フルクタン合成酵素遺伝子については、イネ科モデル植物である *Brachypodium distachyon* へ導入し過剰発現を行い、遺伝子機能解明を行った。

## 4. 研究成果

(1) シバにおける培養系および遺伝子組換え技術の確立

① シバにおける迅速かつ効率的な組織培養技術を確立した。完熟種子由来の胚を外植片に用い、 $5.0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)と  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  ベンジルアミノプリン(BA)を含むMS培地でカルスを誘導し、 $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  チジアズロン(TDZ)、 $0.05 \text{ mg L}^{-1}$   $\alpha$ -ナフタリン酢酸(NAA)および  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  ジベレリン酸を含む培地でシュートを誘導して、植物ホルモンフリーMS培地に移し替えて形成されたシュートを1/2MS培地で発根させて、植物体に再生できた。本培養法は、カルス誘導から植物体再生までにわずか18週間を要するのみで、既報培養法より時間が短縮された(Wang et al. 2010)。

② 得られたシバのエンブリオジェニックカルスを用いてアグロバクテリウムによる遺伝子導入を行う上での諸条件として、アグロバクテリウムの菌株、共存培養の期間、およびアセトシリゴン濃度についての最適条件を明らかにした(Wang et al. 2009)。これらの手法は、他の牧草種でも適用できるものであった(Guo et al. 2009)。

③ シバのエンブリオジェニックカルスを用い、パーティクルガン法により遺伝子導入に関する試験を行い、遺伝子撃ち込みの諸条件や抗生物質を含む選択培地でのカルスの選抜条件等を明らかにした。

④ 新しい形質転換技術を確認するために、シバ完熟種子から切り出した胚を数日間前培養してからパーティクルボンバードメント法やアグロバクテリウム法によって形質転換させる手法を検討した。パーティクルボンバードメント法では、遺伝子を撃ち込む前に、完熟種子由来胚を  $0.3\text{M}$  ソルビトールと  $0.3\text{M}$  マンニトールを含むカルス誘導培地で前培養してから、遺伝子導入を行った。その後、カルスを継代培地に移し換えた。緑色蛍光タンパク質遺伝子(GFP)の発現が細胞で観察され、遺伝子が効率よく導入されたことを確認できた。一方、アグロバクテリウムについても、完熟種子由来胚をカルス誘導培地で7日間前培

養してから、アグロバクテリウムを感染させるところ、最も遺伝子(*GUS*)導入の効率が良かった(図1)。カルスの増殖速度の遅いシバにおいては、完熟種子から切り取った胚に直接遺伝子を導入する手法は、形質転換植物体作出の期間短縮に有効であると考えられた。

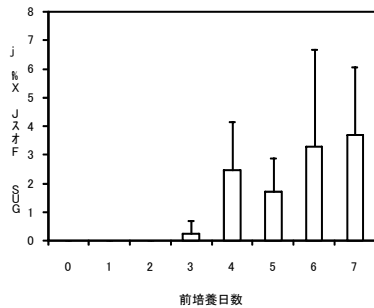


図1. 完熟種子から切り取った胚の前培養日数のアグロバクテリウムによる遺伝子導入効果

## (2) 寒地型牧草由来フルクタン合成酵素遺伝子の機能解析

①寒地型イネ科牧草のペレニアルライグラスから3種類のフルクタン合成酵素遺伝子の cDNA [(*prft-1*:スクロースフルクタン6フルクトシルトランスフェラーゼ(6-SFT)、*prft-3*:フルクタンフルクタン 6G フルクトシルトランスフェラーゼ(6G-FFT) および *prft-4*:スクローススクロース1フルクトシルトランスフェラーゼ(1-SST)]をクローン化に成功した。低温処理条件でのフルクタン合成酵素遺伝子の発現解析の結果、遺伝子間に違いがみられ、6-SFT は低温処理日数が長くなるにつれて発現量が著しく増加し、6G-FFT、1-SST は低温処理 1 日目で顕著な発現増加が見られ、一旦発現量が減少し、再び発現が増加した(Hisano et al. 2008)。

これら3つの遺伝子をシバへ導入することを検討した。これらの遺伝子をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターの下流に組み込んだベクターを構築し、パーティクルガン法およびアグロバクテリウム法によりシバのエンブリオジェニックカルスへ導入を行った。薬剤耐性カルスおよびシュートが得られたが、発現解析の結果、当該遺伝子を導入した形質転換個体を研究期間内に作出することはできなかった。

②チモシーから単離したフルクタン合成酵素(FT)遺伝子の機能解析を行った。当初、シバに遺伝子導入して機能解析をする予定であったが、組換え実験系の確立が遅れたため、イネ科モデル植物を用いて、チモシーから単離した高重合度(DP30 以上)のフルクタンを合成する遺伝子(*PpFT1*)の機能解析を行った。*Brachypodium distachyon*の二倍体自殖系統「Bd21-3」未熟胚由来エンブリオジェニックカルスを用いて、アグロバクテリウム法によりトウモロコシ由来ユビキチンプロモーターに接続した*PpFT1* を導入して、形質転換植物を得た。比較として、低～中程度の重合度(DP20 前後)のフルクタンを主に蓄積するコムギ由来フルクタンを合成する遺伝子

(WFT)についても形質転換植物を得て、評価を行った。3世代自殖を繰り返し、T<sub>3</sub>世代で耐凍性を評価した。FT遺伝子の導入により明らかな生育障害が認められたが、形質転換植物ではフルクタンの生成が認められた。常温下では形質転換植物の耐凍性向上がみられなかったが、低温順化することにより、耐凍性向上がみられた(図2)。重合度が高いフルクタンが蓄積され、また、対照植物との比較で10倍以上の高い含量のグルコース蓄積がみられた。そのため、*PpFT1* を過剰発現させた系統では、単糖の大幅な増加などの糖組成の変化が耐凍性向上に寄与したと推察されたが、生成されるフルクタン重合度と耐凍性の関連性は明確にはならなかった(田村ら2011)。

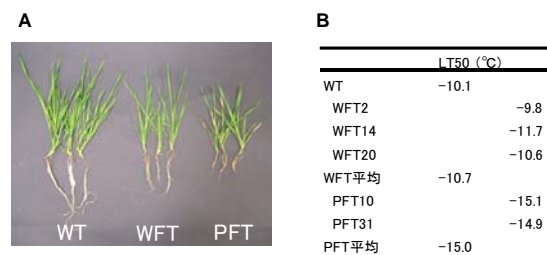


図2. フルクタン合成酵素遺伝子を過剰発現させた*Brachypodium distachyon*における耐凍性

(A)形質転換体の草姿  
(B)低温馴化時の葉身の50%致死温度(電解質漏出法による)  
WT:野生型、WFT:コムギ*wft1*形質転換体、PFT:チモシー*PpFT1*形質転換体

## (3) 寒地型牧草由来 CBF 遺伝子の機能解析

ペレニアルライグラスから単離された2つのCBF 遺伝子(*LpCBF1b*、*LpCBF1Va*)について、上記同様に、シバへ導入して遺伝解析することが困難であったため、シロイヌナズナに導入して、過剰発現させ、その機能の違いを明らかにすることができた(Yamada and Tamura 2010)。*LpCBF1b* は成長を阻害したが、*LpCBF1Va* は開花を遅らせるが、耐凍性が向上することを確認できた(図3)。

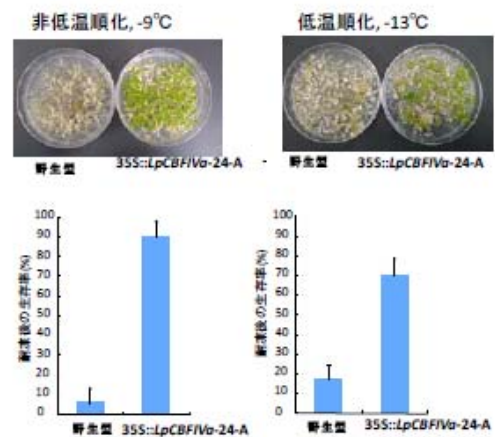


図3. ペレニアルライグラスから単離されたCBF遺伝子(*LpCBF1Va*)を過剰発現した個体における耐凍性

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

- ① S. R. Sandve, A. Kosmala, H. Rudi, S. Fjellheim, M. Rapacz, T. Yamada, O.A. Rognli, Molecular mechanisms underlying frost tolerance in perennial grasses adapted to cold climates. *Plant Science*, 査読有、180巻、2011、69-77
- ② X. Wang, Y. Hoshino, T. Yamada, Rapid and efficient callus induction and plant regeneration from seeds of zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.), *Grassland Science*, 査読有、56巻、2010、198-204
- ③ X. Wang, F.J. Kong, Y. Hoshino, T. Yamada, T. Yamada, Rapid *in vitro* culture and Agrobacterium - mediated transformation system in zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.) , Proceedings of Joint 14th Austrasian Plant Breeding Conference and 11th SABRAO Congress, 査読有、CD版、2009、ページ数無
- ④ Y.-D. Guo, H. Hisano, Y. Shimamoto, T. Yamada , Transformation of androgenic-derived Festulolium plants (*Lolium perenne* L. x *Festuca pratensis* Huds.) by *Agrobacterium tumefaciens* , *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 査読有、96巻、2009、219-227
- ⑤ T. Yamada, Molecular breeding to improve tolerance to abiotic stress, Proceedings on the 1st International Congress on Global Climate Changes and Agriculture, Namik Kemal University, Tekirdag, Turkey, 査読無 2009、135-149
- ⑥ H. Hisano, A. Kanazawa, M. Yoshida, M. O. Humphreys, M. Iizuka, K. Kitamura, T. Yamada , Coordinated expression of functionally diverse fructosyltransferase genes is associated with fructan accumulation in response to low temperature in perennial ryegrass, *New Phytologist*, 査読有、178巻、2008、766-780

[学会発表] (計8件)

- ① 田村健一、眞田康治、田瀬和浩、吉田みどり、山田敏彦、チモシーとコムギ由来フルクタン合成酵素遺伝子を導入したイネ科モデル植物 *Brachypodium distachyon* 形質転換体の比較解析、2011 年度日本草地学会 (震災のため大会中止)
- ② T. Yamada, X. Wang, A. Kanazawa, T. Yamada, Y. Hoshino, N. Ukaji, Genetic improvement through a transgenic approach in *Miscanthus* ssp., a new bioenergy crop、ASA-CSSA-SSSA 2010 International Annual Meeting, 2010年10月31日-11月4日、アメリカ合衆国、ロングビーチ市

- ③ T. Yamada、K. Tamura、Molecular breeding to improve tolerance to abiotic stress in forage grasses、招待講演、6th International Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf、2010年3月15日-18日、アルゼンチン、ブエノスアイレス市
- ④ X. Wang, Y. Hoshino, T. Yamada, Rapid *in vitro* callus induction and regeneration of zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.) and miscanthus (*Miscanthus sinensis* Anderss.)、第65回日本草地学会、2009年3月29日-30日、藤沢市(日本大学)
- ⑤ H. Hisano, A. Kanazawa, M. Yoshida, M. Humphreys, M. Iizuka, K. Kitamura, T. Yamada, The expression regulation of multiple fructosyltransferase genes controls the fructan accumulation in correspondence with low temperature in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)、The Sixth International Fructan Symposium、2008年7月28日-29日、札幌市(ホテルモントレ エーデルホフ札幌)
- ⑥ H. Hisano, K. Tamura, M. Yoshida, A. Kanazawa、T. Yamada、Low-temperature tolerance related *CBF* and fructosyltransferase genes in forage grasses、招待講演、XXI International Grassland Congress、2008年6月29日-7月5日、中国、フフホト市
- ⑦ X. Wang, Y. Hoshino、T. Yamada、Establishing abundant and efficient explants system for *Agrobacterium* - mediated transformation in zoysiagrass, XXI International Grassland Congress、2008年6月29日-7月5日、中国、フフホト市
- ⑧ H. Hisano, K. Tamura, M. Yoshida, A. Kanazawa、T. Yamada、Functional genomics for winter hardiness in forage grasses、招待講演、Plant & Animal Genome XVI、2008年1月12日、アメリカ合衆国、サンディエゴ市

[図書] (計3件)

- ① T. Yamada, K. Tamura, X. Wang, Y. Aoyagi, Transgenesis and genomics in forage crops, In: S.M. Jain and D.S. Brar (eds.), "Molecular Techniques in Crop Improvement, 2nd Edition", Springer, the Netherlands, 2010, pp.719-744
- ② T. Yamada, G.S. Spangenberg, Molecular Breeding of Forage and Turf, Springer, New York, 2009, 352
- ③ Z.-Y. Wang, T. Yamada, Cool Season Forage Grasses, In: C. Kole and T. C. Hall (eds.), "Compendium of Transgenic Crop Plants: Transgenic Cereals and Forage

Grasses”、Blackwell Publishing、Oxford、UK、2008、pp.199-210

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山田 敏彦(YAMADA TOSHIHIKO)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・教授

研究者番号:70343952

### (2)連携研究者

金澤 章(KANAZAWA AKIRA)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号:30281794

田村 健一(TAMURA KEN-ICHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・研究員

研究者番号:10414749